(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 10 月 13 日 (13.10.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/213656 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/138134

(22) 国际申请日: 2021 年 12 月 15 日 (15.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110376388.5 2021年4月6日 (06.04.2021) CN

(71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (**SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES**) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: **李楠 (LI, Nan)**; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 **王蕾 (WANG, Lei)**; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 **王维杰 (WANG, Weijie)**; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 **赵文娟 (ZHAO, Wenjuan)**; 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京中巡通大知识产权代理有限公司 (**BEIJING ZHONG XUN TONG DA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.**); 中国北京市西城区榆树馆胡同东口 1 层 106, Beijing 100195 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

(54) **Title:** FUNCTIONALIZED MAGNETIC BEADS AND ONE-STEP MACROMOLECULE CAPTURE METHOD USING BIO-ORTHOGONAL CHEMISTRY OF SAID MAGNETIC BEADS

(54) **发明名称**: 功能化磁珠及采用其的生物正交化学的大分子一步捕获方法



图 1

AA Alkynyl magnetic beads
BB Click chemistry reaction

(57) **Abstract:** Functionalized magnetic beads and a one-step macromolecule capture method using the bio-orthogonal chemistry of said magnetic beads. The functionalized magnetic beads are magnetic beads modified by non-coupled antibody small molecules, and the method for capturing macromolecules by using the magnetic beads does not involve an antigen-antibody reaction. By using the principle of an azide cycloaddition reaction in click chemistry, the production of non-specific binding proteins is prevented; and by capturing protein biological macromolecules by using a one-step method, the described method is more direct and efficient, has a low background, is suitable for protein capture under denatured conditions, and has wider applicability.

(57) **摘要**: 一种功能化磁珠及采用其的生物正交化学的大分子一步捕获方法, 其中, 功能化磁珠为非偶联抗体小分子修饰的磁珠, 利用该磁珠捕获大分子的方法不涉及抗原抗体反应, 采用点击化学中的叠氮炔环加成反应原理, 避免了非特异性结合蛋白的产生, 一步法捕获蛋白质生物大分子, 更加直接、高效、背景更低, 且适用于变性条件下的蛋白捕获, 适用性更广泛。

WO 2022/213656 A1

[见续页]

AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

功能化磁珠及采用其的生物正交化学的大分子一步捕获方法

技术领域

本发明涉及生物大分子捕获技术领域，具体涉及一种功能化磁珠及采用其的生物正交化学的大分子一步捕获方法。

背景技术

每个细胞的细胞内信号传递和细胞间通信主要依赖于蛋白质的功能及其特定的相互作用，因此，研究蛋白质相互作用是破译细胞生命活动的关键。然而一个哺乳动物细胞约有一万种不同的蛋白质，发生相互作用的蛋白质通常是低丰度的，含量只有不到1%，对于深入鉴定细胞的整个蛋白质组来说将会是巨大的挑战，即使是当今最先进的质谱仪，由于有限的检测速度和动态检测范围，也无法做到低丰度蛋白质的完全鉴定。如果要鉴定时间和空间方面特征的亚蛋白质组，那么这将会是一项更加困难的任务，关键之处在于亚蛋白质组的分离和富集。为了对新合成的蛋白质进行分离，已有研究者开发了一种生物正交非天然氨基酸标记技术（BONCAT, bioorthogonal noncanonical amino acid tagging），这种技术是利用细胞自身翻译机制，使人们能够用生物正交非天然氨基酸来标记、识别和富集新合成的蛋白质亚群，也能结合亚细胞分离技术获得蛋白质在空间分布上的新合成蛋白质及其互作蛋白信息。

在调控生命活动的过程中，除了蛋白质之间的相互作用，RNA和蛋白质之间也会发生互作，从而调节彼此的功能，RNA与蛋白质的相互作用对于维持细胞稳态是非常重要的，而干扰两者的相互作用会造成细胞功能失调和相关疾病的发生。因此研究和鉴定RNA的相互作用网络，有助于科学家解决特定研究问题。而最新的研究方法也应用到生物正交非天然核苷酸标记技术，是利用非天然核苷酸在DNA转录时嵌入到新转录的RNA中，可以对新转录的RNA或新转录的RNA-蛋白质复合物进行标记、识别和富集，后续进行RNA测序以及质谱分析，可以鉴定并得到RNA及其互作蛋白的信息。

上述两种生物大分子标记技术涉及了点击化学（click chemistry）反应和亲和纯化技术。

点击化学（click chemistry）反应是由化学家 K.B.Sharpless 在 2001 年引入的一种化学合成概念，其代表反应是叠氮炔环加成反应，在亚铜离子的催化下，叠氮（azide）基团和炔基（alkyne）反应生成三唑环（triazole），从而把想要的官能团链接起来。亲和纯化技术：通过给蛋白质添加标签，例如：His、GST、HA 及 FLAG 等，利用标签与其特异性配体之间的特异亲和力，使用特异性配体修饰的固相载体对标签化蛋白进行捕获，从而达到分离纯化的目的。

文献 1“BONCAT: Metabolic Labeling, Click Chemistry, and Affinity Purification of Newly Synthesized Proteomes ” (DOI: org/10.1007/978-1-4939-2272- 7_14)公开了生物正交非天然氨基酸标记的蛋白质相互作用的捕获方法，如图 1 所示，细胞在培养时添加叠氮化非天然氨基酸，新合成的蛋白质（橙色）会含有叠氮基团，可通过点击化学反应将带有炔基的生物素亲和标签进行标记。生物素和链霉亲和素可以发生特异性结合，标记的新合成蛋白可以通过 Western blot 分析或使用含有链霉亲和素的固相载体进行亲和纯化、质谱鉴定蛋白质信息。

文献 2“Capturing the interactome of newly transcribed RNA”(DOI: 10.1038/nmeth.4595) 公开了生物正交非天然核苷酸标记的新转录 RNA 相互作用组的捕获方法，如图 2 所示，使用含有炔基的尿嘧啶类似物 EU（5-ethynyluridine）在细胞培养时对新转录的 RNA 进行标记，利用点击化学反应（click reaction）对 EU 标记的 RNA 进行生物素化，通过链霉亲和素固相载体（Streptavidin-coated beads）对生物素化的 RNA 进行亲和纯化，对 RNA 测序和蛋白质组质谱鉴定，即可得到 RNA 及其相互作用组信息。

如上述两篇文献所介绍，在现阶段生物大分子，如蛋白质组、RNA 组学研究中，在细胞培养阶段的某一时间节点下，用一种非天然氨基酸替代对应的天然氨基酸，非天然氨基酸带有炔基或叠氮基团，是天然氨基酸的类似物，在蛋白质合成的过程中会被当作天然氨基酸，嵌入到新生成的蛋白质中，从而使新生蛋白带有炔基或叠氮基团，通过点击化学反应，可以将带有叠氮基团或炔基的分子探针链接在这些蛋白质上，分子探针末端的报告基团含有生物素，能够特异性地与对应链霉亲和素磁珠结合，形成蛋白质-探针-磁珠的复合体，对复合体进行磁性分离、洗去杂质和蛋白洗脱，即可实现新生蛋白

的富集与纯化，最后进行LC-MS分析获得新生蛋白质组信息。

但是，现有的这种生物大分子捕获研究中，蛋白质需要先与探针结合，再利用探针与磁珠的特异性反应，通过两步法将蛋白连接到磁珠上。其主要有以下缺点：1、所使用的磁珠一般是偶联抗体的磁珠，大部分抗体无法耐受变性条件，从而限制了磁珠的使用范围，且抗原抗体的反应偶有非特异性结合的发生；2、所采用的两步法中涉及的分子探针、磁珠，价格均较为昂贵，同时实验需要投入的时间也更久。

文献3“Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis”(DOI：10.1038/nbt.2356)公开了一种含有炔基的树脂，通过在生物大分子添加上叠氮化非天然氨基酸，叠氮基团与树脂的炔基基团发生反应，不涉及抗原抗体反应，避免了非特异性结合蛋白的产生，采用一步法即可实现生物大分子的捕获,但是采用这种方法反应时间长达十几个小时。

发明内容

本发明的目的提供一种功能化磁珠的合成方法及蛋白质生物正交化学的大分子一步捕获方法，用于蛋白质组学研究，其所使用的功能化磁珠为非偶联抗体小分子修饰的磁珠，方法不涉及抗原抗体反应，采用点击化学中的叠氮炔环加成反应原理，避免了非特异性结合蛋白的产生，采用一步法捕获蛋白质生物大分子，更加直接、高效、背景更低，且适用于变性条件下的蛋白捕获，适用性更广泛。

为解决上述技术问题， 本发明提供一种炔基化磁珠，其采用NH_3-PEG4-Alkyne与羧基磁珠偶联合成。

该炔基化磁珠的制备方法如下：

第一步，羧基磁珠悬液进行磁性分离，除去上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，使用移液器缓慢吹打多次，以重悬磁珠，再次磁性分离，去除上清液，重复洗涤多次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，用于活化羧基；

第四步，配置（NH_3-PEG4-Alkyne）第二溶液；

第五步，将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中；

第七步，将第六步获得的混合液置于37℃摇床中，摇晃孵育；

第八步，磁性分离，去除上清液；

第九步，加入乙醇进行吹打重悬，磁性分离，去除上清液，对分离产物重复洗涤，最后重悬磁珠在乙醇水溶液中；

第十步，在4℃的条件下保存。

本发明提供一种叠氮化磁珠，其采用叠氮基丙胺与羧基磁珠偶联合成。

该叠氮化磁珠的制备方法如下：

第一步，羧基磁珠悬液进行磁性分离，除去上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，使用移液器缓慢吹打多次，以重悬磁珠，再次磁性分离，去除上清液，重复洗涤多次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，用于活化羧基；

第四步，配置叠氮基丙胺第二溶液；

第五步，将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中；

第七步，将第六步获得的混合液置于37℃摇床中，摇晃孵育；

第八步，磁性分离，去除上清液；

第九步，加入乙醇进行吹打重悬，磁性分离，去除上清液，对分离产物重复洗涤，最后重悬磁珠在乙醇水溶液中；

第十步，在4℃的条件下保存。

本发明还提供一种生物正交化学的大分子一步捕获方法，其采用功能化磁珠与生物大分子通过点击化学反应获得。

所述功能化磁珠可以为上述制备的叠氮化磁珠或炔基化磁珠。

所述生物大分子可以为嵌入了炔基或叠氮非天然氨基酸的蛋白质，以及嵌入了炔基或叠氮非天然核苷酸的核酸。

所述点击化学反应为叠氮炔环加成反应。

该方法具体包括：

第一步，配置硫酸铜水溶液、抗坏血酸钠水溶液、(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、十二烷基硫酸钠水溶液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸水溶液、尿素水溶液、乙腈水溶液；

第二步，取上面制备的磁珠悬液，使用蛋白或核酸缓冲液置换，重悬于蛋白缓冲液中；

第三步，按顺序依次加入硫酸铜水溶液、抗坏血酸钠水溶液、(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、待捕获的蛋白样品、第二步制备的磁珠悬液和超纯水；

第四步，配置好反应混合液后，放在恒温混匀仪上，孵育；

第五步，磁性分离；

第六步，还原烷基化；

第七步，洗涤磁珠；

第八步，磁珠上的蛋白经胰蛋白酶消化，用于LC-MS分析。

本发明的有益效果

1、现有两步法技术是通过抗原抗体反应来富集蛋白质，为了保证抗体的反应性，磁珠需要在温和的条件下使用，本发明合成的磁珠是小分子修饰的磁珠，不涉及抗原抗体反应，在蛋白质捕获过程中以及捕获后的除杂过程都能够在强变性条件（如含 SDS、尿素、盐酸胍等）下进行，适用范围更广，同时能够更好地去除非特异性结合，背景信号更低；

2、现有技术通过两步法富集蛋白质，本发明只需要一步法，操作简便高效，节省实验时间；

3、现有两步法技术使用的抗体修饰磁珠、分子探针价格较为昂贵，本发明所需的磁珠与反应物价格低廉，一次大量合成可以长期保存和使用，降低了实验成本；

4、现有参考文献3采用了一步法，但是其提供的炔基化树脂，操作性差，体现在固液分离时需要进行离心，并且容易粘附在离心管壁，进行移液操作时树脂丢失率高，固液分离不完全，无法完全移除液体，因此在洗涤树脂时需要进行更多的洗涤步骤，本发明的炔基化磁珠可利用磁性进行固液分离，无需繁琐的离心，分离效率高，节省时间及试剂；

5、现有一步法要求点击化学反应时间较长（18 小时），而本发明只需

反应 1-2 小时，大大节省实验时间。

附图说明

图 1 炔基化磁珠与 Azide-488 反应流程；

图 2 荧光结合效率的检测结果。

具体实施方式

本发明提供一种炔基化磁珠，其采用 NH_3-PEG4-Alkyne 与羧基磁珠偶联合成。

本发明还提供一种叠氮化磁珠，其采用叠氮基丙胺与羧基磁珠偶联合成。

所述羧基磁珠的核心部分为四氧化三铁，外部包覆含有羧基的树脂，优选市售的羧基磁珠。

该炔基化磁珠的制备方法如下：

第一步，羧基磁珠悬液进行磁性分离，除去上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，使用移液器缓慢吹打多次，以重悬磁珠，再次磁性分离，去除上清液，重复洗涤多次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，用于活化羧基；

第四步，配置（NH_3-PEG4-Alkyne）第二溶液；

第五步，将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中；

第七步，将第六步获得的混合液置于 37℃摇床中，摇晃孵育；

第八步，磁性分离，去除上清液；

第九步，加入乙醇进行吹打重悬，磁性分离，去除上清液，对分离产物重复洗涤，最后重悬磁珠在乙醇水溶液中；

第十步，在 4℃的条件下保存。

该制备方法进一步具体为：

第一步，羧基磁珠悬液置于离心管中，放在磁力架上等待 1-3min，进一步优选 2min，进行磁性分离，用移液器吸走并丢弃上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，有机溶剂优选 DMF，每 1ml 第一步使用的羧基磁珠悬液使用 1ml 有机溶剂，使用移液器缓慢吹打 8-12 次，优选 10 次，以重悬磁珠，再次磁性分离 1-3min，优选 2min，去除上清液，重复洗涤 3-5 次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，有机溶剂优选 DMF，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，浓度为 5-15mg/mL，进一步优选为 10 mg/mL；

第四步，配置（NH3-PEG4-Alkyne）第二溶液，浓度为 150mg/mL-250mg/mL，进一步优选 200mg/mL；

第五步,将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中,添加量为 1 ml 磁珠悬液对应 5 ml 第一溶液；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中，添加量为 1 ml 磁珠悬液对应 10μl 第二溶液；

第七步，将第六步获得的混合液置于 37℃摇床中，摇晃孵育 1-3 小时，优选 2 小时；

第八步，磁性分离 1-3min，优选 2min，去除上清液；

第九步，加入乙醇浓度 10%-30%，优选 20%的乙醇溶液，进行吹打重悬，磁性分离 1-3min，进一步优选 2min，去除上清液，对分离产物重复洗涤 4-6 次，最后重悬磁珠在醇浓度 10%-30%，优选 20%的乙醇水溶液中；

第十步，该磁珠悬液保存于 4℃，避免冻结。

该炔基化磁珠的制备方法如下：

第一步，羧基磁珠悬液进行磁性分离，除去上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，使用移液器缓慢吹打多次，以重悬磁珠，再次磁性分离，去除上清液，重复洗涤多次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，用于活化羧基；

第四步，配置叠氮基丙胺第二溶液；

第五步，将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中；

第七步，将第六步获得的混合液置于37℃摇床中，摇晃孵育；

第八步，磁性分离，去除上清液；

第九步，加入乙醇进行吹打重悬，磁性分离，去除上清液，对分离产物重复洗涤，最后重悬磁珠在乙醇水溶液中；

第十步，在4℃的条件下保存。

该制备方法进一步具体为：

第一步，羧基磁珠悬液置于离心管中，放在磁力架上等待1-3min，进一步优选2min，进行磁性分离，用移液器吸走并丢弃上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，有机溶剂优选DMF，每1ml第一步使用的羧基磁珠悬液使用1ml有机溶剂，使用移液器缓慢吹打8-12次，优选10次，以重悬磁珠，再次磁性分离1-3min，优选2min，去除上清液，重复洗涤3-5次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，有机溶剂优选DMF，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，浓度为5-15mg/mL，进一步优选为10 mg/mL；

第四步，配置叠氮基丙胺第二溶液，浓度为150mg/mL-250mg/mL，进一步优选200mg/mL；

第五步,将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中,添加量为1 ml磁珠悬液对应5 ml第一溶液；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中，添加量为1 ml磁珠悬液对应10μl第二溶液；

第七步，将第六步获得的混合液置于37℃摇床中，摇晃孵育1-3小时，优选2小时；

第八步，磁性分离1-3min，优选2min，去除上清液；

第九步，加入乙醇浓度10%-30%，优选20%的乙醇溶液，进行吹打重悬，磁性分离1-3min，进一步优选2min，去除上清液，对分离产物重复洗涤4-6次，最后重悬磁珠在醇浓度10%-30%，优选20%的乙醇水溶液中；

第十步，该磁珠悬液保存于4℃，避免冻结。

本发明还提供一种生物正交化学的大分子一步捕获方法，其采用功能化磁珠与生物大分子通过点击化学反应获得。

所述功能化磁珠可以为上述制备的叠氮化磁珠或炔基化磁珠。

所述生物大分子可以为嵌入了炔基或叠氮非天然氨基酸的蛋白质，以及嵌入了炔基或叠氮非天然核苷酸的核酸。

所述点击化学反应为叠氮炔环加成反应。

所述一步捕获方法具体包括：

第一步，配置硫酸铜水溶液、抗坏血酸钠水溶液、(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、十二烷基硫酸钠水溶液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸水溶液、尿素水溶液、乙腈水溶液；

第二步，取上面制备的炔基磁珠悬液或叠氮磁珠悬液，使用蛋白或核酸缓冲液置换，重悬于蛋白缓冲液中；

第三步，按顺序依次加入硫酸铜水溶液、抗坏血酸钠水溶液、(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、待捕获的蛋白样品、第二步制备的磁珠悬液和超纯水；

第四步，配置好反应混合液后，放在恒温混匀仪上，孵育；

第五步，磁性分离；

第六步，还原烷基化；

第七步，洗涤磁珠；

第八步，磁珠上的蛋白经胰蛋白酶消化，用于LC-MS分析。

本发明提供的上述捕获方法，进一步具体包括：

第一步，配置300-600mmol/L，进一步优选500mmol/L硫酸铜水溶液、0.5mol/L-1.5mol/L，进一步优选1mol/L抗坏血酸钠水溶液、50mmol/L-150mmol/L优选100mmol/L(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、0.5%-1.5%,进一步优选1%的十二烷基硫酸钠水溶液、30mmol/L-60mmol/L，进一步优选50mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸水溶液(pH值为8)、6mol/L-10mol/L，进一步优选8mol/L尿素溶液、20%-40%,进一步优选30%的乙腈水溶液；

第二步，取上面制备的炔基磁珠悬液或叠氮磁珠悬液，使用蛋白或核酸

缓冲液置换 3-5 次，重悬于蛋白缓冲液中；

第三步，按顺序依次加入硫酸铜水溶液、抗坏血酸钠水溶液、(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、待捕获的蛋白样品、第二步制备的磁珠悬液和超纯水，体积比优选为 0.1-0.3:1:0.3-0.5:1-1.5:15-25：20-25,进一步优选 0.2:1:0.5：1.25:20：23.8；

第四步，配置好反应混合液后，放在恒温混匀仪上，温度设置为 25℃，转速 1200rpm-2000rpm，优选 1600rpm，孵育 0.5-1.5 小时，优选 1 小时；

第五步，将反应混合液置于磁力架上进行磁性分离，1-3min，优选 2min，去除上清液；

第六步，向样品中加入还原烷基化试剂，包括：500mM 三(2-羧乙基)膦，1M 氯乙酰胺，10%SDS，50mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸，在 37℃孵育 30min，随后磁性分离去除上清液；

第七步，依次采用十二烷基硫酸钠水溶液洗涤 3-5 次，尿素溶液洗涤 3-5 次，乙腈洗涤 3-5 次，4-羟乙基哌嗪乙磺酸水溶液洗涤 3-5 次磁珠；

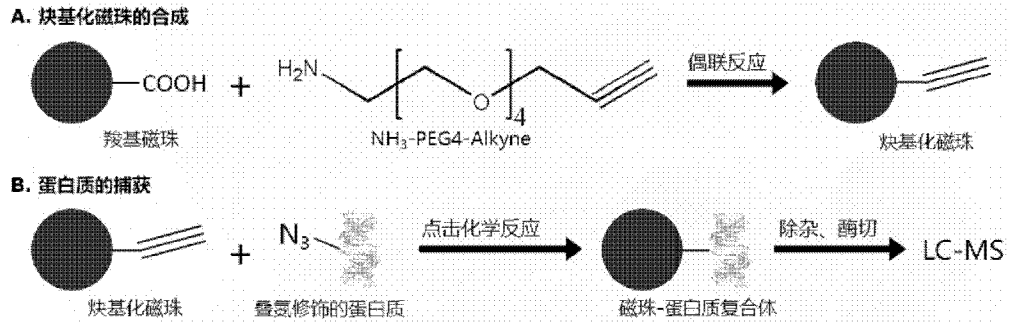
第八步，磁珠上的蛋白经过胰蛋白酶消化，用于 LC-MS 分析。

所述第一步中，尿素溶液是采用 50mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸水溶液(pH 值为 8)作为缓冲液，溶解尿素获得的。

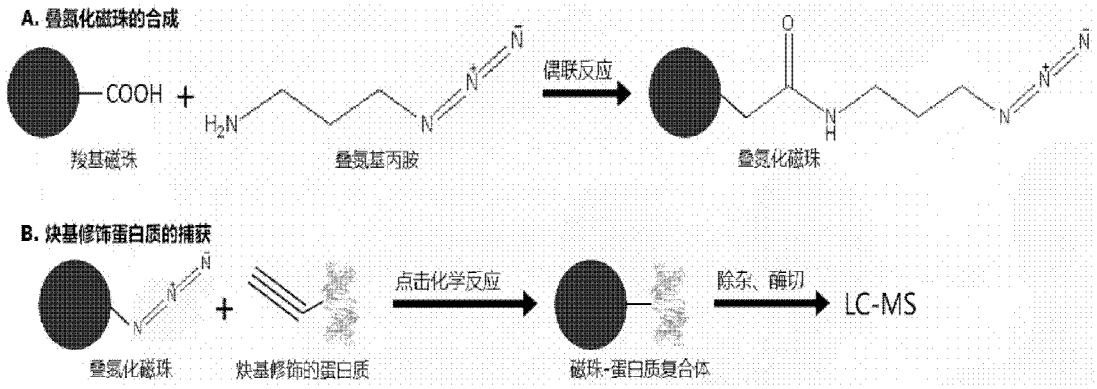
所述第二步中，蛋白缓冲液优选为 RIPA 蛋白缓冲液：25 mM Tris•HCl pH=7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS。

核酸缓冲液优选为 10mM Tris-HCl pH=7.5, 1mM EDTA, 1M NaCl, 0.1%SDS。

炔基化磁珠的合成与蛋白质的捕获流程如下所示：



叠氮化磁珠的合成与蛋白质的捕获流程如图所示：



以下采用实施例来详细说明本发明的实施方式，借此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题，并达成技术效果的实现过程能充分理解并据以实施。

实施例 1 炔基化磁珠

第一步，取 1 mL Beaverbeads™公司生产的 羧基磁珠，型号 70102-5 悬液于 2.0 mL 离心管，放在磁力架上等待 2min，磁性分离后去除上清液；第二步，加入 1 mL DMF (N,N-二甲基甲酰胺)，使用移液器缓慢反复吹吸 10 次，使磁珠悬浮并均匀分散于溶剂中（重悬），磁性分离 2min 后去除上清液，重复洗涤 3 次，最后使磁珠重悬在 1 mL DMF 中；第三步，配制第一溶液：10mg/mL EDC (N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺 盐酸盐)的 DMF 溶液；第四步，配制第二溶液：200mg/mL NPA（NH3-PEG4-Alkyne）的 DMF 溶液；第五步，向第二步的 1 mL 磁珠悬液中加入 5 mL 第一溶液；第六步，向第五步的 6 mL 混合液中加入 10 μL 第二溶液；加入第二溶液后颠倒混匀，置于 37℃摇床中，摇晃孵育 2 小时；反应时间结束后，磁性分离 2min，去除上清液；加入 1 mL 20%乙醇水溶液进行吹打重悬，磁性分离 2min 后去除上清液，重复洗涤 4 次，最后重悬磁珠在 1 mL 20%乙醇水溶液中；该磁珠悬液保存于 4℃。

实施例 2 叠氮化磁珠

采用与实施例 1 相同的制备方法，区别在于采用 200mg/mL 叠氮基丙胺的 DMF 溶液替代 200mg/mL NPA（NH3-PEG4-Alkyne）的 DMF 溶液。

实施例 3 叠氮修饰的蛋白质

培养细胞至覆盖率到达 80%；去除细胞中旧的培养基，加入 5 mL PBS 缓冲液（来自 biological industries，货号 02-023-1A），轻轻摇晃，去除上清液，重复清洗 2 次；加入 10 mL 无甲硫氨酸的培养基，放入 37℃的细胞培养箱，培养 30min；去除前面的细胞培养基，加入 10 mL 无甲硫氨酸的培养

基；向实验细胞中加入 10μL 的 100 mM L-叠氮基高丙氨酸的 DMSO 溶液（叠氮化甲硫氨酸，来自 thermo scientific，货号 C10102）对蛋白质进行叠氮化标记；轻摇均匀，放入 37℃的细胞培养箱，培养 6 小时；对培养皿中的细胞用 5 mL PBS 缓冲液洗涤一次；用细胞刮刀轻轻地把细胞刮下，收集于 1.5 ml 离心管中，通过 200 rcf 离心 5min 去除上清液；向细胞沉淀加入 200μL RIPA 细胞裂解液（来自 thermo scientific，货号 89900），重悬细胞，冰浴 30min；将细胞悬液放在冰水浴中，使用超声破碎仪，破碎细胞；将样品，在 4℃下，用 20000 rcf 离心 10min；转移上清液至新的离心管，此为提取的细胞蛋白溶液，含有叠氮修饰的蛋白；使用 BCA 蛋白检测试剂盒（来自 thermo scientific，货号 23227）测定总蛋白浓度；取 1mg 的蛋白溶液，进行下面的点击化学反应。

比较例 1

采用文献 3 中的方法制备炔基化树脂悬液。

采用本发明实施例 1 制备的炔基化磁珠和比较例 1 提供的炔基化树脂进行生物正交化学的大分子一步捕获，如下表 1 所示。

表 1 蛋白捕获方法。

	本发明提供的叠氮化蛋白捕获方法	文献 3 的叠氮化蛋白捕获方法
第一步	准备点击化学催化剂（硫酸铜、抗坏血酸钠、THPTA 混合液），配制 500 mmol/L 硫酸铜水溶液，配制 1 mol/L 抗坏血酸钠水溶液，配制 100 mmol/L THPTA（三（3-羟丙基三氮基甲基）胺)的水溶液，加入 2μL 配置好的硫酸铜、10μL 配置好的抗坏血酸钠，5μL 配置好的 THPTA	同左
第二	加入 1mg 实施例 3 的蛋白质样	同左

步	品，浓度 2mg/ml，蛋白质样品上	
第三步	取实施例 1 制备的炔基化磁珠悬液 20μL，使用 RIPA 蛋白缓冲液置换 3 次，最后重悬于 20μL 蛋白缓冲液中	加入比较例 1 制备的炔基化树脂 200μL
第四步	将第一步至第三步的成分按比例配置，采用超纯水定容到 500μL 配置好反应混合液后，放在恒温混匀仪上，设置温度 25℃，转速 1600 rpm，反应 1 小时	将第一步至第三步的成分按比例配置，采用超纯水定容到 500μL 配置好反应混合液后，放在恒温混匀仪上，设置温度 25℃，转速 1600 rpm，反应 18 小时
第五步	将样品放置在磁力架，通过磁性使磁珠聚集，去除上清液	同左
第六步	加入 200μL 混合液，包括还原剂 500 mmol/L 三(2-羧乙基)膦 4μL、烷基化试剂 1mol/L 氯乙酰胺 16μL、2μL 分散剂 0.1%SDS 和 pH 缓冲剂 4-羟乙基哌嗪乙磺酸水溶液 178μL，在 37℃反应 30min，随后磁性分离，去除上清液	加入还原剂 200 微升 10mM 二硫苏糖醇在 70℃反应 15min，室温再反应 15min；磁性分离去除上清液；加入烷基化试剂 200 微升 40mM 碘乙酰胺，室温下反应 30min，磁性分离去除上清液
第七步	使用 1%SDS 溶液，磁性分离去除上清液，洗涤 5 次	同左第六步
第八步	使用 8mol/L 尿素溶液，磁性分离去除上清液，洗涤 3 次	同左第七步
第九	使用 30%乙腈水溶液，磁性分离	使用 8mol/L 尿素溶液，通过重力

步	去除上清液，洗涤 3 次	或离心去除流穿液，洗涤 5-10 次
第十步	使用酶切缓冲液 4-羟乙基哌嗪乙磺酸，磁性分离去除上清液，洗涤 3 次	使用 30%乙腈水溶液，通过重力或离心去除流穿液，洗涤 5-10 次
第十一步	使用酶切缓冲液 4-羟乙基哌嗪乙磺酸重悬磁珠，加入胰蛋白酶进行酶切	使用酶切缓冲液(100 mM 三-（羟甲基）氨基甲烷，2 mM 氯化钙，10%乙腈构成)重悬树脂，加入胰蛋白酶进行酶切

反应后的磁珠用流式细胞技术（FCM）对磁珠上的荧光进行定量分析，实验流程如图 1。检测结果如图 2，图 2A 和 2B 表示了炔基化磁珠（红）与结合了 488nm 荧光基团的炔基化磁珠（绿）在分别在荧光通道（FITC）响应情况，图 2C 表明超过 99%的磁珠都结合了荧光。说明完成了捕获。

所有上述的首要实施这一知识产权，并没有设定限制其他形式的实施这种新产品和/或新方法。本领域技术人员将利用这一重要信息，上述内容修改，以实现类似的执行情况。但是，所有修改或改造基于本发明新产品属于保留的权利。

以上所述，仅是本发明的较佳实施例而已，并非是对本发明作其它形式的限制，任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容，依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型，仍属于本发明技术方案的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种功能化磁珠，其特征在于：所述功能化磁珠为炔基化磁珠，其采用 NH_3-PEG4-Alkyne 与羧基磁珠偶联合成。

2、权利要求 1 所述功能化磁珠的制备方法，其特征在于，包括：

第一步，羧基磁珠悬液进行磁性分离，除去上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，使用移液器缓慢吹打多次，以重悬磁珠，再次磁性分离，去除上清液，重复洗涤多次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，用于活化羧基；

第四步，配置（NH_3-PEG4-Alkyne）第二溶液；

第五步，将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中；

第七步，将第六步获得的混合液置于 37℃摇床中，摇晃孵育；

第八步，磁性分离，去除上清液；

第九步，加入乙醇进行吹打重悬，磁性分离，去除上清液，对分离产物重复洗涤，最后重悬磁珠在乙醇水溶液中；

第十步，在 4℃的条件下保存。

3、一种功能化磁珠，其特征在于：所述功能化磁珠为叠氮化磁珠，其采用叠氮基丙胺与羧基磁珠偶联合成。

4、如权利要求 3 所述功能化磁珠的制备方法，其特征在于，包括：

第一步，羧基磁珠悬液进行磁性分离，除去上清液；

第二步，在分离产物中加入有机溶剂，使用移液器缓慢吹打多次，以重悬磁珠，再次磁性分离，去除上清液，重复洗涤多次分离产物，重悬磁珠在有机溶剂中，获得磁珠悬液；

第三步，配置(N-（3-二甲基氨基丙基）-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)第一溶液，用于活化羧基；

第四步，配置叠氮基丙胺第二溶液；

第五步，将第三步获得的第一溶液加入第二步获得的磁珠悬液中；

第六步，将第二溶液加入第五步获得的磁珠悬液中；

第七步，将第六步获得的混合液置于37℃摇床中，摇晃孵育；

第八步，磁性分离，去除上清液；

第九步，加入乙醇进行吹打重悬，磁性分离，去除上清液，对分离产物重复洗涤，最后重悬磁珠在乙醇水溶液中；

第十步，在4℃的条件下保存。

5、一种生物正交化学的大分子一步捕获方法，其特征在于：采用功能化磁珠与生物大分子通过点击化学反应获得，所述功能化磁珠为权利要求1所述的炔基化磁珠或权利要求3所述的叠氮化磁珠。

6、如权利要求5所述的生物正交化学的大分子一步捕获方法，其特征在于：所述生物大分子可以为进行了炔基化或叠氮化的蛋白质或核酸。

7、如权利要求5或6所述的生物正交化学的大分子一步捕获方法，其特征在于：所述点击化学反应为叠氮炔环加成反应。

8、权利要求5-7任一项所述的生物正交化学的大分子一步捕获方法，其特征在于，包括：

第一步，配置硫酸铜水溶液、抗坏血酸钠水溶液、(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、十二烷基硫酸钠水溶液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸水溶液、尿素水溶液、乙腈水溶液；

第二步，取权利要求1或2制备的磁珠悬液，使用蛋白或核酸缓冲液置换，重悬于蛋白缓冲液中；

第三步，按顺序依次加入硫酸铜水溶液、抗坏血酸钠水溶液、(三(3-羟丙基三氮基甲基)胺)水溶液、待捕获的蛋白样品、第二步制备的磁珠悬液和超纯水；

第四步，配置好反应混合液后，放在恒温混匀仪上，孵育；

第五步，磁性分离；

第六步，还原烷基化；

第七步，洗涤磁珠；

第八步，磁珠上的蛋白经胰蛋白酶消化，用于LC-MS分析。

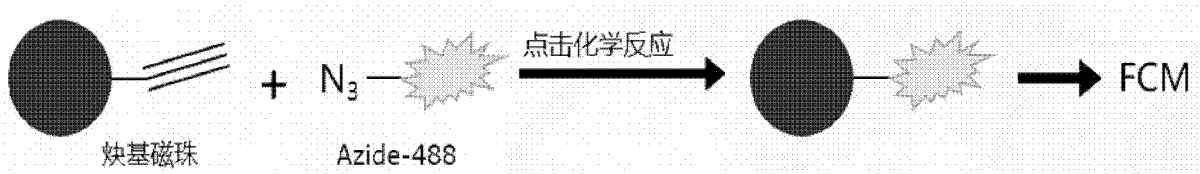

点击化学反应
N_3
FCM
炔基磁珠
Azide-488

图 1

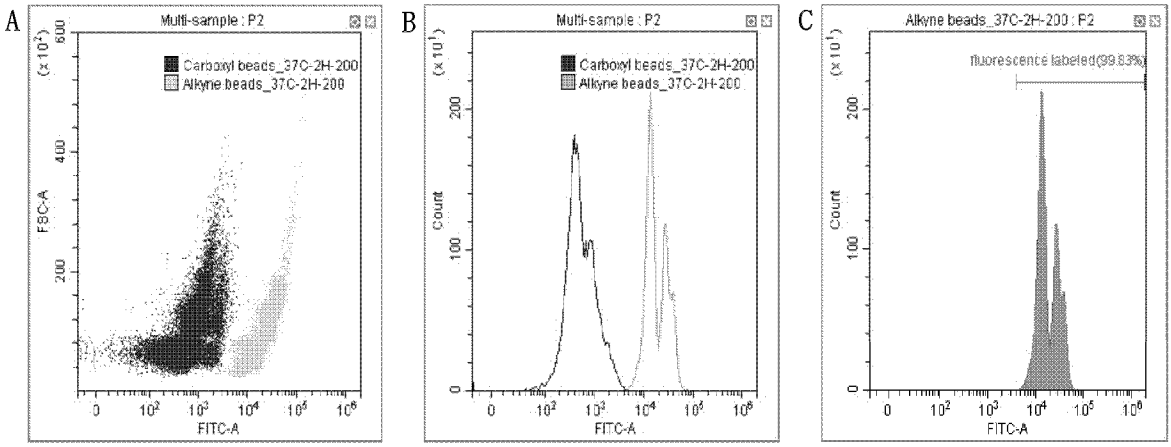

A
Multi-sample : P2
Carboxyl beads_37C-2H-200
Alkyne beads_37C-2H-200
FSC-A
FITC-A
B
Multi-sample : P2
Carboxyl beads_37C-2H-200
Alkyne beads_37C-2H-200
Count
FITC-A
C
Alkyne beads_37C-2H-200 : P2
fluorescence labeled(99.83%)
Count
FITC-A

图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/138134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/-; C12N 15/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNTXT, VEN: 磁珠, 羧基, 炔基, 叠氮, 点击化学, 点击反应, magnetic bead, carboxyl, alkyne, alkynylated, azide, azidated, click chemistry

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113092784 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 July 2021 (2021-07-09) claims 1-8	1-8
X	CN 110726841 A (HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY) 24 January 2020 (2020-01-24) description, paragraphs 43-49	1-4
Y	CN 110726841 A (HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY) 24 January 2020 (2020-01-24) description, paragraphs 43-49	5-8
Y	CN 102412046 A (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) 11 April 2012 (2012-04-11) paragraphs 94-107	5-8
A	CN 110684075 A (TIANJIN REAL AB MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 14 January 2020 (2020-01-14) entire document	1-8
A	CN 104313130 A (SOUTH CHINA NORMAL UNIVERSITY) 28 January 2015 (2015-01-28) entire document	1-8

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 February 2022	**23 February 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106039320 A (GUANGZHOU GAOTONG BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 26 October 2016 (2016-10-26) entire document	1-8
A	US 2011129834 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP.) 02 June 2011 (2011-06-02) entire document	1-8
A	US 2016237114 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 18 August 2016 (2016-08-18) entire document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/138134

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 113092784 A	09 July 2021	None	
CN 110726841 A	24 January 2020	CN 110726841 B	31 July 2020
CN 102412046 A	11 April 2012	CN 102412046 B	16 April 2014
CN 110684075 A	14 January 2020	None	
CN 104313130 A	28 January 2015	CN 104313130 B	13 October 2017
CN 106039320 A	26 October 2016	None	
US 2011129834 A1	02 June 2011	WO 2011066330 A2	03 June 2011
US 2016237114 A1	18 August 2016	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/138134

A. 主题的分类

G01N 33/68(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N 33/-; C12N 15/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNKI,CNTXT,VEN, 磁珠，羧基，炔基，叠氮，点击化学，点击反应，magnetic bead, carboxyl, alkyne, alkynylated, azide, azidated, click chemistry

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113092784 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2021年7月9日 (2021-07-09) 权利要求1-8	1-8
X	CN 110726841 A (华中农业大学) 2020年1月24日 (2020-01-24) 说明书第43-49段	1-4
Y	CN 110726841 A (华中农业大学) 2020年1月24日 (2020-01-24) 说明书第43-49段	5-8
Y	CN 102412046 A (上海交通大学) 2012年4月11日 (2012-04-11) 第94-107段	5-8
A	CN 110684075 A (天津锐尔康医药科技有限公司) 2020年1月14日 (2020-01-14) 全文	1-8
A	CN 104313130 A (华南师范大学) 2015年1月28日 (2015-01-28) 全文	1-8
A	CN 106039320 A (广州高通生物技术有限公司) 2016年10月26日 (2016-10-26) 全文	1-8
A	US 2011129834 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 2011年6月2日 (2011-06-02) 全文	1-8

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年2月16日	2022年2月23日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	边昕
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(010)-62085677

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/138134

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2016237114 A1 (PURDUE RES FOUND) 2016年8月18日 (2016-08-18) 全文	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/138134

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113092784	A	2021年7月9日		无		
CN	110726841	A	2020年1月24日	CN	110726841	B	2020年7月31日
CN	102412046	A	2012年4月11日	CN	102412046	B	2014年4月16日
CN	110684075	A	2020年1月14日		无		
CN	104313130	A	2015年1月28日	CN	104313130	B	2017年10月13日
CN	106039320	A	2016年10月26日		无		
US	2011129834	A1	2011年6月2日	WO	2011066330	A2	2011年6月3日
US	2016237114	A1	2016年8月18日		无		